Biologische und biochemische Untersuchungen über Spur-Pheromone der Termite Zootermopsis nevadensis

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie
eingereicht dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Horst Ronning
aus Minden

Marburg/Lahn 1972

Biologische und biochemische Untersuchungen über Spur-Pheromone der Termite Zootermopsis nevadensis

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie
eingereicht dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Horst Ronning
aus Minden

Marburg/Lahn 1972

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Vom Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg als

Dissertation angenommen am 12. 12. 1972

Tag der mündlichen Prüfung 22. 12. 1972

Referent Prof. Dr. Dr.h.c. P. Karlson

Correferent Prof. Dr. W. Wesemann

Meiner Mutter
und meiner Frau
in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

A Einleitung und Fragestellung 3

Pheromonbegriff, Spurpheromone der Insekten, spurwirksame Substanzen, Literaturübersicht über Insekten-Pheromone

B Material und Methoden 9

Biologischer Test
Chemische Extraktaufarbeitung
Wasserdampfdestillation
Drehbandkolonnendestillation
Analytische Gaschromatographie
Präparative Gaschromatographie
Massenspektrometrie

C Ergebnisse 19

Spuraktivitätsbestimmungen
Gaschromatographische Analysen
Gaschromatographische Fraktionierung
Massenspektren

D Diskussion 34

E Zusammenfassung 37

F Literaturverzeichnis 39

A Einleitung und Fragestellung

Pheromone sind nach KARLSON und LÜSCHER [41] biologisch aktive Naturstoffe, die meist in minimalen Mengen als Signalstoffe zwischen Individuen einer Art wirksam sind und spezifische Reaktionen auslösen können. Den Beweis der substantiellen Wirkung erbrachten BUTENANDT u.a. [12, 13, 14] mit der Analyse und Darstellung des Sexuallockstoffes des Weibchens des Seidenspinners Bombyx mori, des Hexadecadienol (BUTENANDT u.a. [15], TRUSCHEIT u.a. [88]), das als chemisches Stimulans von SCHNEIDER u.a. [77] und SCHNEIDER [78] biologisch im Elektroantennogramm getestet wurde.

Substanzen, die zwischen Individuen verschiedener Arten wirksam sind, werden als Allomone (Warn- und Wehrsekrete) oder Kairomone (Futter- und Beutedüfte) bezeichnet (BROWN e.a. [8], WHITTAKER e.a. [94]).

Solche der intra- und interspezifischen Kommunikation dienenden chemischen Koordinationssignale finden sich in nahezu allen Stämmen des Tierreiches als Aggregationsstoffe, Sexuallockdüfte, Aphrodisiaka, Territoriumsgerüche, Spurenstoffe, Alarmstoffe und Repellents (BUTLER [16], WILSON [100], KAISSLING [40]).

Pheromone einzelliger Organismen könnten als funktionelle Vorläufer der Hormone interpretiert werden (HALDANE [31]); LEVINSON [45] nennt die Hormone im Hinblick auf die stammesgeschichtliche Entwicklung somit das interzelluläre Äquivalent der Pheromone. Hormon, per os aufgenommen, kann auch als Pheromon wirken (LÜSCHER [49]).

Die Pheromone werden meistens in speziellen Zellen des Ektoderms bzw. in Hautdrüsen produziert (MYKYTOWYCZ [65]). Sie wirken direkt auf die Verhaltensweise eines anderen Individuums oder über das endokrine System auf die Reaktionsbereitschaft gegen andere Signale (WILSON e.a. [97]).

Die Grundlagen der Geruchsrezeption sind von KAISSLING [40] umfassend dargestellt worden, die Physikochemie der spezifischen Erregung einzelner Riechzellen von KAFKA [37, 38] und SCHNEIDER [79]. Feinstrukturen und Mechanismen der Sekretion wurden von NOIROT e.a. [66, 67], STUART e.a. [85], QUENNEDEY [71, 72] und MERTINS e.a. [58] elektronenoptisch untersucht.

"Nachrichten" sind bei sozialen Insekten von besonderer Bedeutung (BLUM e.a. [8]). Die biologischen Grundlagen ihrer Verhaltensphysiologie sind sehr genau untersucht und bilden die Voraussetzung zur Untersuchung der übertragenden Stoffe (SCHMIDT [76]). Neben der Raumorientierung, dem Auffinden von Nahrungsquellen und der Anlockung des Sexualpartners spielt bei ihnen die soziale Aufgabendetermination der Staatenmitglieder eine hervorragende Rolle (WILSON [101], BUTLER [17], BLUM [6]). Stoffe zur Wegmarkierung sind bei einer ganzen Reihe von Insektenarten nachzuweisen. Eigenschaften wie Funktion von Duftspuren wurden erstmals an Ameisen von WILSON [95, 96, 97] untersucht. Sekretanteile unterschiedlicher Votalität, die von Minuten bis Wochen reicht, wurden festgestellt (MOSER [62, 63]); eine Hauptkomponente wurde identifiziert (TUMLINSON e.a. [89, 90]) und deren Spezifität und die analoger Substanzen bestimmt (SONNET e.a. [82]). GABBA e.a. [28] geben eine Übersicht der interspezifischen Wirksamkeiten von Spursubstanzen bei Ameisen.

Bei Arthropoden berichtet BLUM [7], dass die Spezifität eines chemischen Signals gesteigert werden kann durch Mischung von Pheromonen, deren Informationsgehalt ein Geruchsreflex mehrerer zusammenwirkender Verbindungen ist. Transport- und Empfangsuntersuchungen eines Amphipoden mit markierten Substanzen machten DAHL e.a. [23].

Neuere Untersuchungen weisen auf die Bedeutung der Pheromone auch für höhere Tiere hin (MEINWALD e.a. [57]), etwa für Reviermarkierungen (HUMMEL [33]), insbesondere aber ihren Einfluss auf den Östrogenzyklus bei Mäusen, auf die Adrenalinproduktion oder auf das Verhältnis des endokrinen Systems (BRUCE [10], McCLINTOCK [53]). Pheromonwirkungen bei Primaten beschreiben COMFORT [21], MICHAEL e.a. [59, 60] und CURTIS e.a. [22].

In einer Übersicht über in Beziehung zum Sexualgeschehen stehender Wirkstoffe geht PANDEL [68] bei der Untersuchung der Einflüsse auf das Sexualverhalten und die -funktion besonders ein auf die Beziehung von Geruchsstoffen zur menschlichen Sexualität.

Beobachtungen über Kommunikation zwischen Individuen sind bei Insekten seit langem gemacht und beschrieben worden unter anderem in den Arbeiten von URBAHN [91], v.FRISCH [27], SUTTON [87], FORD [26], BARTH [1], HIERHOLZER [32], CARTHY [19, 20], EVANS [25] und SCHWINCK [80].

Die Spurlegung der Termiten ist mangels anderer physikalischer Verständigungsmöglichkeiten von grosser Bedeutung (GOETSCH [29]). LÜSCHER u.a. [47] fanden am Hinterrand des 4. Sterniten eine Drüse,

deren Sekret durch Anpressen des Abdomens an den Boden austritt und eine Duftspur bildet, der andere Tiere folgen. Ein Ätherextrakt zeigte die gleiche Wirkung. Der Spur wurde auch ohne Berührung mit Antennen oder Tarsen gefolgt, so dass es sich um einen Duftstoff handeln musste. Dieser war artspezifisch; Extrakt aus Kalotermes wirkte auf Zootermopsis abschreckend (LÜSCHER [46, 48], STUART [83, 84, 86]).

Über die chemische Natur spurbildender Substanzen bei Termiten war bis vor wenigen Jahren noch wenig bekannt. Zwar konnte VERRON [92] aus Kalotermes eine attraktive Substanz, cis-Hexen-(3)-ol-(1), isolieren, die allerdings in keiner Drüse sondern im Darm durch Holzverdauung gebildet wird. BECKER [2] fand den beim Holzabbau durch Basidiomyceten entstehenden, frassauslösend wirkenden p-Hydroxybenzaldehyd. Auch ESENTHER [24], WATANABE e.a. [93] sowie MOORE [61] fanden aktive artspezifische Extrakte von Reticulitermes bzw. Nasutitermes, deren Struktur nicht aufgeklärt werden konnte. Weitere Untersuchungen von MATSUMURA e.a. [52], RITTER e.a. [73] sowie RITTER [74], insbesondere auch mit Extrakten des Futterholzes, auf dem der Pilz Lencites trabea gewachsen war, identifizierten einen primären Olefinalkohol, n-Dodecatrien-1-ol, der mit $< 0{,}1$ pg auf der Spur wirksam war. Aufsehenerregend und für die Untersuchungsmethodik von Bedeutung war das Auffinden einiger wirksamer, unspezifischer Spursubstanzen, die BECKER [3] und BECKER u.a. [4] aus bestimmten Kugelschreiberminen unter anderem als Monobutyl- und -äthyläther des Diäthylenglykols isolierten.

Auf die Spurwirksamkeit eines auch in der Technik verwendeten Produktes, der Phthalatester, wiesen schon HUNNEMAN [36] und HUMMEL [33] hin.

Einen Sexuallockstoff von der Haut und den Faeces der weiblichen Stubenfliege identifizierten CARLSON e.a. [18] als z-9-Tricosen.

Bisher sind von den 27 Insekten-Ordnungen erst bei 7 chemisch identifizierte Pheromone bekannt, über die MacCONNEL [51] einen umfassenden Überblick gibt. Über die Entwicklung und den Stand der Pheromonforschung berichten zusammenfassend KARLSON u.a. [43].

Für die Termite Zootermopsis nevadensis hatten KARLSON u.a. [42], HUMMEL u.a. [35] und HUMMEL [34] umfangreiche Untersuchungen zur Auffindung von deren Spurpheromon durchgeführt. Zur Prüfung verschiedener chemischer Substanzen benutzten sie den von LÜSCHER u.a. [47] angegebenen und von KARLSON u.a. [42] weiterentwickelten Spurfolgetest. Sie prüften zahlreiche Substanzen und fanden zwei spurwirksame Verbindungen, n-Capronsäure und Farnesol; während der Terpenalkohol im Termitenextrakt nicht nachgewiesen wurde, konnte die Hexansäure als ein wirksamer Pheromon-Bestandteil angesprochen werden. Allerdings ergaben histochemische Analysen Hinweise auf das Vorhandensein von höheren Terpenen (STUART e.a. [85], STUART [86]). Zwei verschiedene Pheromone, ein Spur-Pheromon während des Nymphen- und ein Sex-Pheromon während des Adult-Stadiums unterschied PASTEELS [69].

In dieser Arbeit soll, aufbauend auf den Erfahrungen und Ergebnissen dieser Untersuchungen versucht werden, durch möglichst gezieltes Testen weiterer Substanzen und durch sorgfältige Aufarbeitung von Termiten-Extrakten stark spuraktive Pheromone aufzufinden, sie zu analysieren und als solche zu identifizieren. Mit solchen hochaktiven Substanzen können dann Untersuchungen ihrer biologischen Chemie gemacht werden, die vielleicht Aufschluss geben über morphologische und funktionelle Mechanismen der Pheromone.

B Material und Methoden

Biologischer Test

Die biologische Austestung von Substanzen wurde im wesentlichen mit dem von LÜSCHER u.a. [47], KARLSON u.a. [42] und HUMMEL [33] beschriebenen Test ausgeführt, dessen Methode allerdings in einigen Punkten verbessert werden konnte.

Der Versuchsraum, in dem auch die Tiere gehalten wurden, entsprach den Forderungen nach möglichst guter Konstanz der äusseren Bedingungen. Umluft hielt die Temperatur in dem fensterlosen Raum bei etwa 23° C, die relative Feuchtigkeit bei etwa 60 %. Der hier nicht beeinflussbare Luftdruck wurde mit einem kleinen Barographen gemessen, um diesen anscheinend wichtigsten Parameter des biologischen Tests zu kontrollieren.

Leider waren nicht sehr viele Versuchstiere vorhanden, so dass die Kolonien für die Tests zu häufig gestört werden mussten, was nicht nur die Zucht effektiv verhindert, sondern auch den Wert der Tests in Frage stellen kann (LÜSCHER [50]). Eine Optimierung der Störintervalle würde Testabstände von mehreren Wochen bis einigen Monaten erfordern. Es wurde deshalb darauf geachtet, die Lauftests so gut wie möglich zeitlich einzuteilen. Zweimal konnten nach längeren Ruhepausen in zwei Kolonien geflügelte Tiere beobachtet werden, und in einem Falle waren später kleine Jungtiere in dem Koloniebehälter. Über das Lebensalter der Termiten können keine präzisen Angaben gemacht werden, dabei wäre seine Kenntnis eine wichtige

Prämisse in der Beurteilung des "physiologischen (Riech-)alters". Im übrigen kann zu häufiger Spurtest-Einsatz durch evtl. Gewöhnung zu Irritationen führen.

Die Ausführung des Lauftests ist bei HUMMEL [33] genau beschrieben. Eine ursprünglich vorgesehene Änderung der Laufstreckengeometrie, statt der eckigen eine mehr biologische Sinuskurve, wurde fallen gelassen, um frühere Ergebnisse vergleichen zu können, und weil zweifellos mit zählbaren Grössen ein Resultat klarer interpretiert werden kann. Jedoch wegen der wiederholt gemachten Beobachtung, dass die Versuchstiere beim Lauf über eine Ecke "hinauszuschiessen" scheinen, die auch BECKER u.a. [5] gemacht hatten, sollte die Spurgeometrie weiter diskutiert werden. Stark spurwirksame Substanzen konnten ohne weiteres nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip ausgewertet werden.

Geändert wurden die Form und die Grösse der Wartekammer, in die die Versuchstiere gesetzt werden, bevor sie durch ein Schlupfloch die eigentliche Laufkammer betreten können. Es war beobachtet worden, dass die Tiere darin gern an den Seiten entlang laufen und dabei geradeaus am Schlupfloch vorbei. Oft verging viel Zeit, bis die Termiten, besonders wenn eine nicht-aktive Substanz sie nicht anlockte, in die Laufkammer kamen. Die Wartekammer wurde deshalb wie eine Birne geformt, an deren engster Stelle sich das Schlupfloch befand, zu dem die Tiere so "zwangsläufig" geführt wurden. Vergrössert wurde diese Kammer, damit sich darin mehrere Versuchstiere ohne mehrfaches Umsetzen beruhigen können.

Für die Beobachtung des Lauftests wurde eine wesentliche Erleichterung erreicht durch eine Verbesserung der Beleuchtungsverhältnisse. Die Laufkammer wurde nicht mehr mit einer 15 W - Glühlampe mit vorgeschaltetem Rotfilter beleuchtet; hierbei entstanden durch das auffallende Licht Reflexe, die die Beobachtung des Lauftests erschwerten, oft bis zur Ermüdung des Beobachters. Eine Fläche einer Plexiglasplatte von der Grösse 22 x 14 x 1,5 cm wurde geschrägt, wodurch seitlich einfallendes Licht abgelenkt wird. An der dickeren Längsseite wurde eine Lichtleiste angebracht, die mit zehn Glühlämpchen 6 V je 0,6 W, Farbe rot, in Parallelschaltung bestückt war (Abb. 1). Als Spannungsquelle diente ein

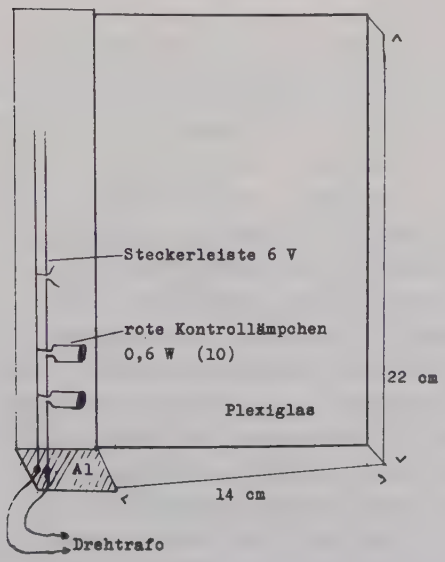


Abb. 1 : Lichtplatte für die Beobachtung der Termiten-Spur beim Lauftest

6 V - Transformator, mit dessen veränderlichem Vorwiderstand die Lichtintensität beliebig geregelt werden kann. Sie konnte also etwa nach Adaptation so abgeschwächt werden, dass eine evtl. mögliche Lichtbeeinflussung des Testverhaltens der Tiere weitgehend auszuschliessen war. Weil bei dieser Anordnung das Licht nicht gerichtet ist, sondern flächig diffus von unten kommt, ist die Möglichkeit irgendeines Lichteinflusses wohl ganz zu verneinen. Bei der Beobachtung des Lauftests waren die Termiten deutlich als schwarze Punkte auf dem leicht rötlich erscheinenden Papieruntergrund zu sehen.

Chemische Extrakt-Aufarbeitung

Wasserdampfdestillation

Es standen drei Ampullen mit Äther-Extrakten zur Verfügung, über deren Beschaffung und Herstellung HUMMEL [33] berichtet hat. Zur Abtrennung der flüchtigen Substanzen wurden die Extrakte der Wasserdampfdestillation unterworfen. Um schon hier Verluste möglichst zu vermeiden, wurden die Teile der Apparatur durch Kugelschliffe verbunden, die sie zu einem geschlossenen System ohne allzu grosse Glasverspannung machten (Abb. 2). Der in einem 2 L - Kolben erzeugte Wasserdampf wurde über einem Erhitzer, dessen Leistung durch einen Regeltransformator gesteuert werden konnte, auf etwa 125° C erhitzt und strömte dann durch ein schräges Einleitungsrohr in den Reaktionskolben, in dem sich der Extrakt befand. Das Destillat wurde in zwei Vorlagen aufgefangen, die durch Eiswasser bzw. Kältegemisch gekühlt wurden. Nach etwa zwei Stunden ist die Destillation beendet.

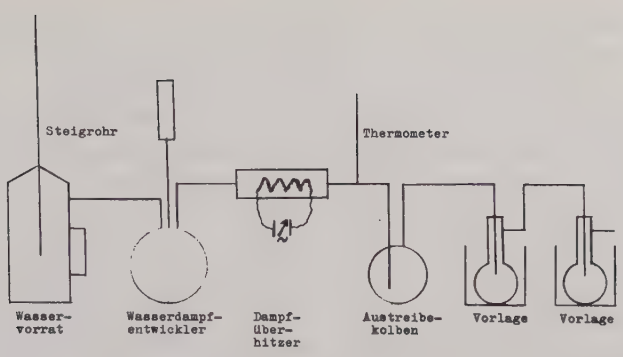


Abb. 2 : Apparatur zur Wasserdampfdestillation

Nur in der ersten Vorlage ist der typische Geruch der offenbar biologisch wirksamen Bestandteile zu erkennen. Diese etwa 1 Liter Wasserphase wurden in etwa fünf Schritten mit etwa 1/2 - 3/4 L Pentan im Scheidetrichter bei Zimmertemperatur vorsichtig ausgeschüttelt, um schaumige Emulsionen zu vermeiden.

Pentanreinigung

Da das Pentan als p.a.-Qualität nur mit einem Reinheitsgrad von 99 % mit Verunreinigung besonders störender aromatischer Bestandteile käuflich war, wurde es im Wasserbad über eine etwa 1,5 m lange versilberte, mit Glaskörpern gefüllte Vakuummantelkolonne im Rücklaufverhältnis 1 : 5 destilliert. Etwa 3/4 der übergegangenen Menge wurde unter denselben Bedingungen noch zweimal redistilliert und damit eine gaschromatographische Reinheit erreicht.

Drehbandkolonnen-Destillation

Die durch Ausschütteln gewonnene Pentan-Lösung wurde direkt (ohne Zwischenschaltung eines Rotationsverdampfers) über eine Drehbandkolonne eingeengt. Es wurde eine innenversilberte Kolonne von 1 m Länge (Fa. NORMAG) benutzt, deren Teflon-Spirale mit 1700 U/min gedreht wurde von einem Rührmotor, der mit einer Gummikupplung weitgehend vibrationsfrei aufgesetzt war. Der 500 ml - Kolben wurde mit einem PILZ-Korb erhitzt; die Einhaltung des Siedepunktes war mit Hilfe einer Phasenanschnittsteuerung exakt möglich. Das Rücklaufverhältnis konnte mit einem sehr gut dosierenden Hahn auf 1 : 10 eingestellt werden. Bei Kühlung des Rührmotors durch einen Ventilator konnte die Destille tagelang wartungsfrei arbeiten. Das Destillat wurde gaschromatographisch als reines Lösungsmittel bestimmt. Der auf etwa 1 - 2 ml eingedampfte Rückstand der Drehbandkolonnen-Destillation hat einen eigenartigen, ganz typischen Geruch. Proben von ihm wurden im Gaschromatographen aufgetrennt.

Analytische Gaschromatographie

Es stand ein VARIAN-Gerät (Fa. WILKENS) Aerograph 1520, ein 2-Säulen-System mit Flammenionisations- und Wärmeleitfähigkeits-Detektoren, zur Verfügung; die Werte wurden mit einem 2-Kanal-Schreiber (Fa. METRAWATT) aufgezeichnet. Die Methode und Theorie werden bei KAISER [39] beschrieben.

Die Trennung des Pheromon-Konzentrats wurde in Stahl- und Glassäulen mit verschiedenen Flüssigphasen ausgeführt. Als stationäre Phasen wurden Substanzen verschiedener Polarität ausprobiert:

Emulphor O, Polyäthylenglycoladipat (Carbowax 1500), Diäthylglycolsuccinat, Apiezon L und Methylsilicongummi. Die Glassäulen wurden selbst hergestellt, und zwar wurde Emulphor 10 %ig belegt auf Chromosorb WAW 80/100 mesh, PEGA 3 %ig auf Chromosorb WAW 100/120 mesh, DEGS 6 %ig auf Varaport 30 80/100 mesh, Apiezon 10 %ig auf Chromosorb WAW 60/80 mesh und SE 30 3 %ig auf Chromosorb WAW-DMCS 100/120 mesh.

Die Chromatogramme der über Stahl- und Glassäulen getrennten Proben waren ohne merklichen Unterschied. Entsprechend den Überlegungen über das Trennverhalten der gesuchten Substanzen, die mit der Dampfphase bei der Wasserdampfdestillation aus dem Rohextrakt übergegangen waren, und den Erfahrungen von HUMMEL [33] zeigte eine mit der relativ unpolaren Flüssigphase SE 30 3 %ig auf Chromosorb WAW-DMCS aufgezogene Säule mit den Massen 5 ' x 1/8 " die am günstigsten scheinenden Trennleistungen.

Präparative Gaschromatographie

Es war nun naheliegend, die beim Chromatographieren getrennten Fraktionen aufzufangen, um mit dem jeweiligen Kondensat den Spurtest auszuführen, der als biologische Analyse die Spurwirksamkeit eines bzw. einzelner Peaks bestimmen würde.

Wegen der eminent geringen Mengen, die in dem Gesamtextrakt zu erwarten sind, waren die Versuche von HUMMEL [33] nicht zuletzt wegen der technischen Unzulänglichkeiten des überalterten Gerätes nicht sehr zufriedenstellend verlaufen. Zwar konnte dabei auf SE 30 bei Säulentemperaturen um 191° C in drei Gipfeln der Hauptteil der eingespritzten Spuraktivität wieder aufgefangen werden; weitere angewandte Bestimmungsmethoden führten zu Phthal-

säureestern, als deren Herkunft nach Ausschluss anderer Quellen die Kunststoff-Flaschen erkannt wurden, in denen die Extrakte aufbewahrt worden waren und deren Material diese synthetischen Verbindungen häufig als Weichmacher enthalten.

Hier wurde das Extraktgemisch in einem halbautomatischen Gaschromatographen F 21 (Fa. PERKIN-ELMER) * präparativ fraktioniert. Mit diesem Gerät ist die Darstellung von acht Fraktionen möglich; aus technischen Gründen wurden nur vier eingesetzt, die jedoch schon durch die Abtrennung des Lösungsmittels und des wahrscheinlich "lipiden" Restes Hinweise auf die Lage aktiver Peaks geben könnten. Die Auffanggefässe hingen in einem Kühlgemisch von Isopropanol / N_2. Die zum Gerät gehörenden Kühlfallen scheinen jedoch für das Arbeiten mit so geringen Mengen nicht geeignet. Das sorgfältige Ausspülen mit nur wenigen Tropfen Lösungsmittel führte letztlich doch zu einer erheblichen Substanzverdünnung. Es kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass ein erheblicher Teil der aufgefangenen Fraktionssubstanz an der Gefässwand haften bleibt. Es sind kleinere Kühlfallen angefertigt worden (Abb. 3), die mit einem Teflon-Konus als Adapter an den Ausgang des Chromatographen angeschlossen werden können.

* Das Gerät stand im Pharmazeutischen Institut Marburg (Dir. Prof. Dr. H. BOEHME) unter freundlicher Mithilfe von Herrn Apotheker H. ROEBER zur Verfügung

Abb. 3 : Kühlfalle für die präparative Gaschromatographie

Daraus lassen sich dann unter Lösung in einem Tropfen direkt Substanz-Proben entnehmen, mit denen sich die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen erhärten lassen werden in biologischen und gaschromatographisch-massenspektrometrischen Analysen.

Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse der im Gaschromatogramm gewonnenen Peaks wurde mit einem Massenspektrometer LKB 9000 (Fa. LKB Producter) * durchgeführt. Die Methodik dieses Gerätes, das als spezifischer Detektor für ionisierbare organische Substanzen dient, ist bei RYHAGE [75] beschrieben.

* Ich danke Herrn Dr. U. MURAWSKI und Herrn Prof. Dr. H. EGGE vom Institut für Physiologische Chemie Bonn (Dir. Prof. Dr. F. ZILLIKEN) für ihre freundliche Hilfe

Beim GC - MS - gekoppelten System wird eine Substanzprobe in den Einspritzblock des Gaschromatographen gegeben, und die Auftrennung erfolgt in einer Stahl-Kapillarsäule von 100 ' Länge, bezogen trägerfrei mit DEGA. Wenn im aufgezeichneten Chromatogramm ein Gipfel sein Maximum erreicht, wird ein bestimmter Massenbereich in 2 sec durchfahren. Enthält ein GC-Peak nur eine Substanz, stellt sich diese ohne Überlagerung im Massenspektrogramm dar mit dem Peak ihrer Masse und einer regelmässigen Folge von um 14 Masseneinheiten verminderten Peaks entsprechend den abgesprengten CH_2-Gruppen. Sind in einem GC-Gipfel mangels Trennvermögen mehrere Substanzen enthalten, lassen sich die dann überlagerten Massenspektren dennoch unterscheiden, in schwierigeren Fällen durch Auswertung mit einem Computer, dessen Werte in Tabellen-Handbüchern die gesuchten Substanzen ausweisen. Eine Einführung zur Interpretation von Massenspektren gibt McLAFFERTY [56].

C Ergebnisse

Spuraktivitätsbestimmungen

Wenn man die Literatur über die bisherigen Untersuchungen der Chemie der Pheromone studiert und vergleicht, kommt man zu der Feststellung, dass auf der einen Seite die Natur ziemlich wahllos sich in ihrer chemischen Struktur sehr verschiedener Kommunikations-Substanzen zu bedienen scheint, dass andererseits aber die schon analysierten Substanzen gewisse, wenn auch nur spekulative Hinweise geben können (KARLSON u.a. [43]). Insbesondere die Arbeiten zur chemischen Aufklärung der Spurpheromone bei Zootermopsis nevadensis hatten neben gesicherten Ausschlüssen auch stark spur-verdächtige Substanz-Klassen aufgezeigt, die wert erscheinen liessen, weitere Vertreter dieser Gruppen auf ihre Spurwirksamkeit näher zu untersuchen. Dabei fanden die Ergebnisse der verschiedenen Bestimmungsmethoden, die HUMMEL [33] angewendet hatte (IR- und UV-Spektrometrie, Chromatographie, Ermittlung von Retentionsinkrementen, Massenspektrometrie), besondere Berücksichtigung.

Einige verfügbare Vertreter der Terpen-Reihe, Hydroxyderivate des Cymols, das sich bekanntlich in einigen ätherischen Ölen findet, und ihre Substitutionsprodukte wurden teils als Wiederholungsversuche auf ihre Spurwirksamkeit ausgetestet, weiter ungesättigte Alkohole, die Äthylester der Fettsäuren mit Kohlenstoffzahlen von 3 - 14, einige Fettsäure-Methylester und ungesättigte oder Epoxisäuren (Tab. 1).

Tab. 1

Substanzen, die im biologischen Test auf ihre Spurwirksamkeit geprüft wurden

Freie Säuren	SE/mg
Pelargon-	
Caprin-	
Undecan-	
Laurin-	
Tridecan-	$<10^2$
Myristin-	
Undecylen-	
trans-2-Dodecen-	
α-Hydroxy-undecan-	

Alkohole	SE/mg
Undecan-	
Hexadecan-	
Heptadecan-	$< 10^3$
Octadecan-	
Eicosan-	

Fettsäure-Methyl-Ester	SE/mg
Caprin-	10^2
Laurin-	10^5
Tridecan-	10^2
Myristin-	
Pentadecan-	
Hexadecan-	$<10^1$
Heptadecan-	
Octadecan-	
Nonadecan-	
Decen-	10^2
Undecen-(10)-	$5\cdot10^3$

Fettsäure-Äthyl-Ester	SE/mg
Propion-	
Butter-	
Valerian-	
Hexan-	$< 10^1$
Heptan-	
Octan-	
Nonan-	
Decan-	10^1
Undecan-	10^2
Laurin-	10^7
Myristin-	10^4
Acryl-	10^2
Undecen-(10)-	$5\cdot10^6$

Nach Schätzungen, die nur ganz grob gemacht werden können, enthält eine Termite etwa 100 ng Spurpheromon; nach Exstirpations- und Extraktionsversuchen von LÜSCHER [50] entspricht diese Menge etwa 5000 SE, wonach 1 SE also etwa 20 pg äquivalent ist. Somit kann als Ergebnis vom Spuraktivitätstest nur eine Substanz von Interesse sein, die den daraus abzuleitenden Wert von $5 \cdot 10^7$ SE/mg oder einen dieser Grössenordnung erreicht.

Es ist also sinnvoll, Verbindungen auszutesten, deren Spuraktivität mindestens so stark ist wie bei den bereits gefundenen Capronsäure und Farnesol. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen, die der Definition der Spureinheit zugrunde liegen, bedeutet das, dass Substanzverdünnungen bis 10^{-6} eine gute Spurwirksamkeit aufweisen sollten; denn ein im Test beispielsweise gefundener, sogar möglichst anzustrebender Wert von 1 SE würde mit dem Faktor 10^5 definitionsgemäss eine Spuraktivität von 10^5 SE/mg ergeben. Diese Grösse würde der in obiger Überlegung errechneten um zwei Grössenordnungen nahekommen.

Es handelt sich bei diesen Versuchen um Arbeiten mit biologischen Objekten, deren Verhaltensreaktionen sehr stark vom physiologischen Status und mehrerer biotischer bzw. abiotischer Umweltfaktoren abhängen (PRIESNER [70]); besonders unterschiedliche Reaktionen der Versuchstiere konnten bei Luftdruckwechsel beobachtet werden. Wechselwirkungen zwischen solchen Fakten und physiologischem Zustand der Individuen bedingen Verhaltensweisen, die aus ihrer Empfindlichkeit der biologischen Parameter zu Ergebnissen führen, die sich wohl nur in Grössenordnungen angeben lassen. Die Ergebnisse, die mit den meisten der oben angeführten Verbindungen gewonnen

wurden, bestätigten die Werte von HUMMEL [33] in der Grössenordnung; die Wiederholungsversuche für Capronsäure und Farnesol allerdings zeigten geringere Aktivitäten.

Die Äthylester der Fettsäuren bis C_{10} ergaben Spuraktivitäten bis höchstens 10^3 SE/mg, und sie sind als Spursubstanzen auszuschliessen. Acrylsäureäthylester etwa hat 100 SE/mg. Säuren wie z.B. trans-2-Dodecensäure oder α-Hydroxy-undecansäure haben keine Spuraktivität.

Die Methyl- und Äthylester der ungesättigten C_{11}-Carbonsäure zeigen interessante Ergebnisse. Während der Undecen-(10)-säure-methyl-ester nur eine Aktivität von 10^3 SE/mg hat, erweist sich ihr Äthyl-ester als hochwirksam mit $5 \cdot 10^6$ SE/mg.

Methyl- und Äthylester der C_{12}-Carbonsäure zeigen ähnlich hohe Aktivitäten. Die des Laurinsäure-methyl-esters beträgt mehr als 10^5 SE/mg, die des Äthyl-esters 10^7 SE/mg.

Die Ester der höherhomologen C_{14}-Carbonsäure dagegen sind als spurunwirksam anzusehen; der Wert für den Myristinsäure-äthyl-ester ist weniger als 10^3 SE/mg, der Methyl-ester ist praktisch unwirksam.

Die hier angegebenen Werte sind aus mehreren Versuchsreihen zusammengefasst; die Schwankungsbreite der einzelnen Testreihen kann etwa eine Grössenordnung betragen.

Die Maximalwerte wurden bei bestimmten, optimalen Substanzverdünnungen ermittelt. Geringere Konzentrationen führten naturgemäss zu niederen Werten, weil das biologische Vermögen zur Ecken-Entscheidung beim Lauftest statistisch relativ stärker gegen einen Schwellenwert abnimmt. Höhere Konzentrationen

jedoch zeigten ebenfalls das Bild einer Aktivitätsminderung. Die abschreckende Wirkung hoher Konzentrationen von an sich spurwirksamen Substanzen hatten WILSON [99] und MOSER e.a. [64] bei Ameisen beobachtet, und HUMMEL u.a. [35] hatten diese Erscheinung auch für Termiten erwähnt.

Die Spuraktivität des Undecensäureäthylesters ist $5 \cdot 10^6$ SE/mg bei einer Konzentration von 10^{-8} und fällt bei der Verdünnung von 10^{-6} auf $5 \cdot 10^4$ SE/mg; bei der Verdünnung von 10^{-4} ist die Spurwirksamkeit auf 10^3 SE/mg gefallen, und die Versuchstiere zeigen deutliche Schreckreaktionen. - Bei dem Laurinsäureäthylester fällt die Aktivität von 10^7 SE/mg bei der Konzentration 10^{-6} auf $5 \cdot 10^2$ SE/mg bei der von 10^{-4}; bei der Verdünnung 10^{-2} sind nur Schreckreaktionen zu beobachten, die Termiten betreten gar nicht die Spur.

Es konnte beobachtet werden, dass Tiere an einer Spurecke zögernd reagierten, an der beim Auftragen der gelösten Spursubstanz aus der Kapillare ungleichmässig mehr ausgeflossen war, was im Halblicht recht gut gesehen werden konnte.

Gaschromatographische Analyse

Es musste nun eine Antwort gefunden werden auf die Frage, ob die gefundenen stark spurwirksamen Substanzen, deren Aktivitäten dem geschätzten Wert des natürlichen Pheromons nahekamen, auch seine Bestandteile sind. Das sollte in weiteren Untersuchungen des Termiten-Extraktes geklärt werden.

Die drei vorgefundenen Äther-Extrakte von Termiten, die von Herrn Profs. LÜSCHER und KARLSON und Herrn Dr. HUMMEL im August 1963 bzw. 1968 in Kalifornien gesammelt worden waren, sind in mehreren Schritten aufgearbeitet worden. Die Abtrennung der flüchtigen Substanzen geschah durch die Wasserdampfdestillation. Nach dem Ausschütteln mit hochgereinigtem Pentan und Einengen des Lösungsmittels über eine Drehbandkolonne verblieb ein Rest von 1 - 2 ml Pheromon-Konzentrat, das aus einer Vielzahl von Substanzen besteht. Es ist möglich, diese gaschromatographisch an einer relativ unpolaren Flüssigphase zu trennen. Die besten Trennergebnisse liefert Methylsilicongummi SE 30 als stationäre Phase. Zwei Chromatogramme sind in Abb. 4 wiedergegeben, die unter folgenden Bedingungen aufgezeichnet wurden:

eingespritzte Probenmenge 1 µl
Ofentemperatur 200° C
Injektor- und Detektortemperatur 220° C
Detektor FID
Säule 5' x 1/8" Stahl
stationäre Phase 3 % SE 30
auf Chromosorb WAW-DMCS 100/120 mesh
Trägergas N_2 27 ml/min
Elektrometer-Verstärkung 10^4
Schreiber-Eingangsempfindlichkeit 10 bzw. 20 mV

Zwischen den Extrakt-Analysen wurden Vergleichssubstanzen chromatographiert, die im Spurtest sich als wirksam erwiesen hatten. Unter Wahrung identischer Bedingungen konnten so deren Retentionswerte ermittelt und mit den Extrakt-Peaks verglichen werden. Wenn diese Vergleichsanalysen auch auf Säulen mit anderen Trennflüssigkeiten gleiche Retentionszeiten ergeben, wird der Hinweis auf Substanz-Identität erhärtet.

Die Retentionszeiten aus 14 Analysen der Termiten-Extrakte sind in Tab. 2 denen von Vergleichssubstanzen gegenübergestellt. Die grösste Schwierigkeit

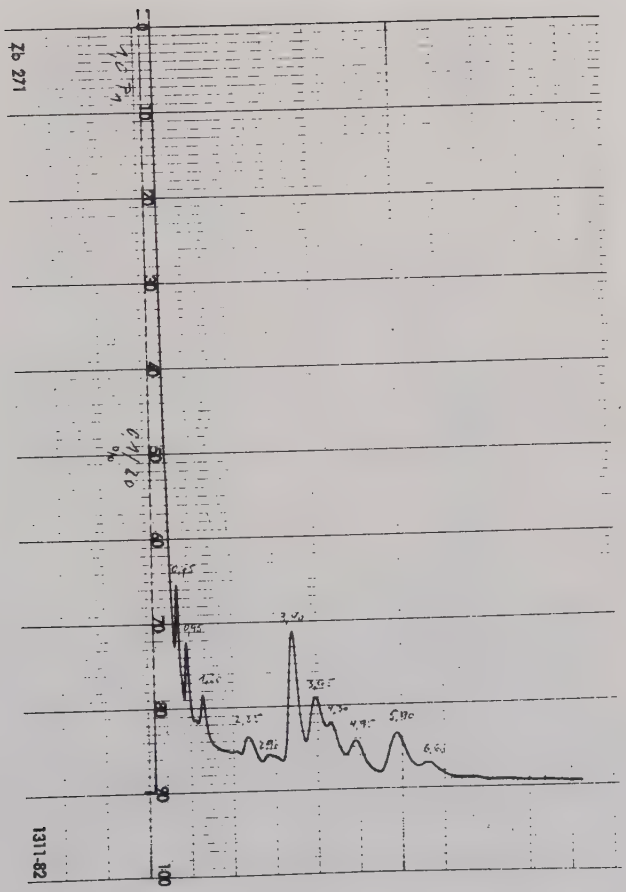


Abb. 4a : Gaschromatogramm vom aufgearbeiteten Termiten - Extrakt 1
(Analysebedingungen S. 24)

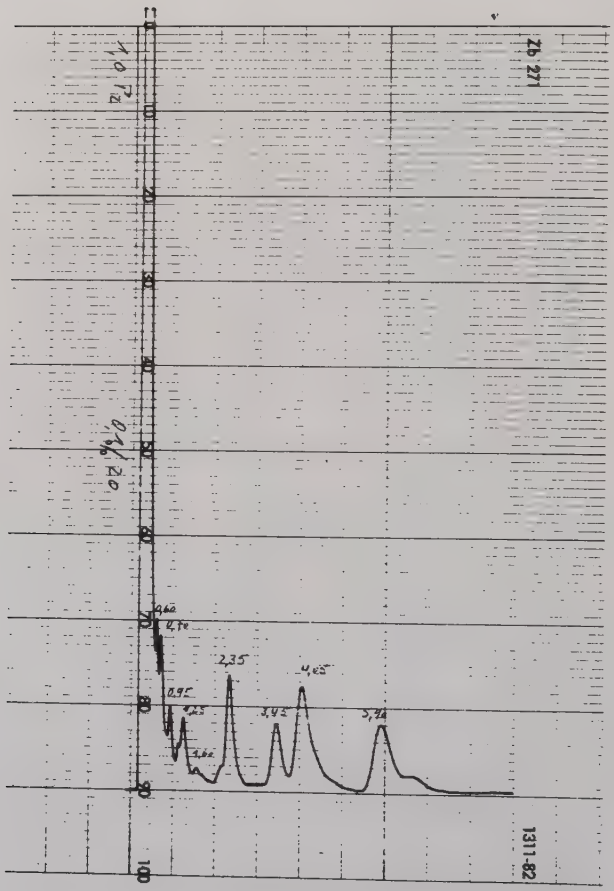


Abb. 4b : Gaschromatogramm vom aufgearbeiteten Termiten - Extrakt 2
(Analysebedingungen S. 24)

Tab. 2

Retentionszeiten aus 14 Analysen auf einer Stahlsäule 5' x 1/8" 3 % SE 30 auf Chromosorb WAW-DMCS 100/120 mesh 200° C isoth. Trägergas N_2 27 ml/min

Termiten - Extrakte 1, 2 u. 3 (Äther)

0,60*	0,73	0,93	1,28	1,58*	2,35	2,78+
3,40	3,95	4,20	4,78	5,80	6,40	

\+ nur Extrakt 1
* nur Extrakt 2

Retentionszeiten von Vergleichssubstanzen (unter gleichen Bedingungen)

Undecensäureäthylester	0,6	(spurwirksam)
Dodecansäuremethylester	0,7	(spurwirksam)
Tridecansäureäthylester	0,9	

liegt in der Darstellung der frühen Peaks, die oft gegen die relativ grosse Menge des Lösungsmittels nicht differenzierbar sind. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen sind möglicherweise zwei spurwirksame Substanzen mit Bestandteilen des natürlichen Pheromons identisch. Hier könnte eine massenspektrometrische Analyse weiteren Aufschluss geben und vielleicht zum Ziele führen.

Gaschromatographische Fraktionierung

Zunächst jedoch sollte versucht werden, das Extraktgemisch präparativ-gaschromatographisch

zu fraktionieren. Die Auftrennung wurde in einem präparativen Gaschromatographen unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

eingespritzte Probenmenge 2 µl
Ofentemperatur 200° C isoth.
Detektor FID 1/2
Trägergas N_2 250 ml/min
Teilerverhältnis 1 : 10
Säule 450 x 8 mm Stahl
stationäre Phase 5 % SE 52
auf Chromosorb GAW-DMCS 60/80 mesh

Insgesamt wurden 50 Proben eingespritzt, die bei einer Trenndauer von jeweils etwa 1/4 Stunde in zwei Tagen aufgetrennt sind. Auf Grund von Vorversuchen wurde die Fraktionierung bestimmt; nach 2, 3 und 4,5 Minuten wurden die getrennten Substanzgase, gesteuert durch Magnetventile, in vier Fraktionsgefässen aufgefangen. Zugleich wurden zur Kontrolle Chromatogramme aufgezeichnet, von denen eines in Abb. 5 gezeigt wird.

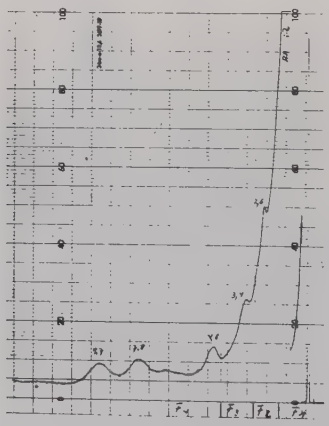


Abb. 5 : Präparatives Gaschromatogramm mit vier Fraktionen

Die mit den in Pentan aufgenommenen Fraktionen angestellten Spurtests sind sehr unbefriedigend verlaufen. Die Ergebnisse der biologischen Auswertung lassen sich nicht eindeutig signifikant vergleichen, wenn auch die Aktivität der zweiten Fraktion am höchsten erschien (Tab. 3).

Tab. 3

Spuraktivitäten der gaschromatographisch-präparativ gewonnenen Extrakt-Fraktionen

Fraktion 1	Fraktion 2	Fraktion 3	Fraktion 4	
$1 - 5\ 10^1$	$10^2 - 10^3$	$\sim 5\ 10^1$	$\sim 10^1$	SE/mg

(Diese Zahlen sind nur mit grosser Vorsicht zu werten, da durch das Aufnehmen der Kondensate aus den Kühlfallen bzw. durch deren mögliche Adhäsion an den Glaswänden [Fettsäureester!] erhebliche Abweichungen aufgetreten sein können)

Massenspektrometrische Analyse

Die Massenspektrometrie ist eine der besten analytischen Methoden. Ihre Theorie wird bei KIENITZ [44] ausführlich behandelt, die Zusammenhänge von Mechanismus und Struktur in der organischen Chemie werden von GOULD [39] abgehandelt.

Die Bedingungen, unter denen die Massenspektren gewonnen wurden, sind folgende:

eingespritzte Extrakt-Menge 7 µl
Säule 100' S.C.O.T. DEGA 160° C
Einspritzblock 260 - 280° C
Separator 280° C
Ionenquelle 250° C
Fallenstrom 60 µA
Beschleunigungsspannung 3,5 kV
Ionisierungsenergie 70 eV

Die eingespritzte Probe des Termiten-Extraktes wird in der Kapillarsäule aufgetrennt und das Chromatogramm aufgezeichnet (Abb. 6). Die Massenspektrogramme der einzelnen Peaks ergaben im wesentlichen nur höhere Kohlenwasserstoffe mit Kohlenstoffzahlen von 20 und höhere Homologe, die wohl insgesamt als Substanzen aus dem Fett- und Hautgewebe der Termiten anzusprechen sind.

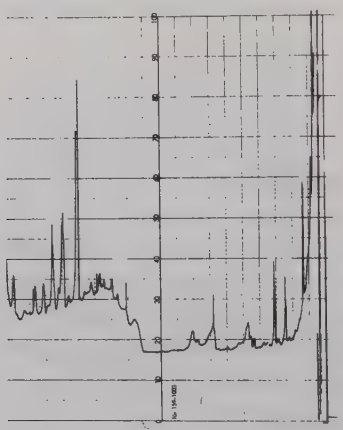


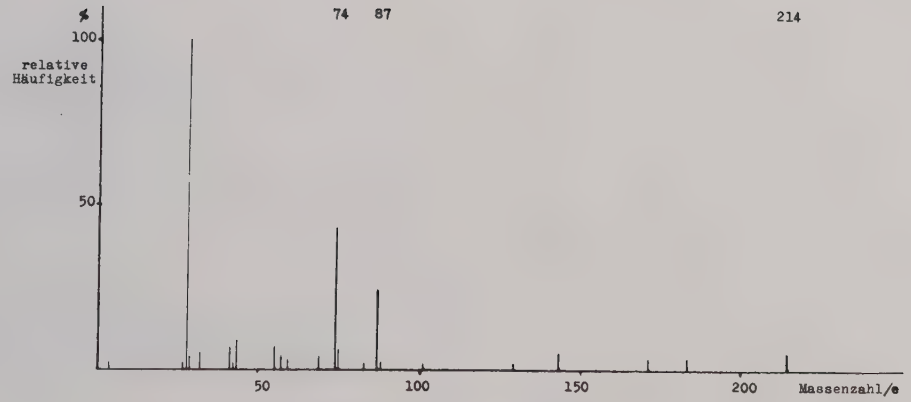
Abb. 6 : M S - Separator-Gaschromatogramm

Das Massenspektrum des Separator-Peaks 7 ist mit seinen Massenzahlen und deren relativer Häufigkeit in Tab. 4 wiedergegeben und in Abb. 7 dargestellt. Die massenspektrometrische Analyse zeigt in diesem Peak eine Substanz der Masse 214 mit ihren Bruchstücken. Die aufgetretenen Massen 74 und 87 stammen aus einer für Ester typischen Umlagerung (McLAFFERTY [54, 55], SHARKEY e.a. [81]), die einer thermischen Zerfallsreaktion bei der thermischen Spaltung von Estern vergleichbar ist. Die analysierte Substanz der Masse 214 wird durch die Massen der McLAFFERTY-Umlagerung eineindeutig bestimmt als Laurinsäuremethylester.

Tab. 4

Massenspektrum vom Separator-Peak 7

Massenzahl	relative Häufigkeit
4	2
27	2
28	100
29	4
32	5
41	7
42	2
43	9
55	7
57	4
59	3
69	4
74	43
75	6
83	2
87	24
88	2
101	2
129	2
143	5
171	3
183	3
214	3



Ionisierungsenergie	70 eV
Beschleunigungsspannung	3,5 kV
Fallenstrom	60 µA
Ionenquelle	250° C
Separator	280° C
Einspritzblock	260 - 280° C
Säule	100' S.C.O.T. DEGA 160° C

Abb. 7 : Massenspektrum des Separatorpeaks 7

Auch der Geruch des gereinigten Extraktes ist typisch für Methyl- bzw. Äthylester der Fettsäuren C_8 - C_{12}. Nach alkalischer Verseifung der Substanz mit einem Überschuss konzentrierter $NaOCH_3$-Lösung in CH_3OH ist die Spurwirksamkeit auf etwa 1/10 des ursprünglichen Wertes abgefallen.

Nicht in allen aufgearbeiteten Extrakten war im Chromatogramm des Massenspektrographen dieser definierte Peak aufgetreten, und eine Substanz der Masse 214 konnte nicht gefunden werden. Eine Erklärung ist vielleicht darin zu suchen, dass während der Aufarbeitung bei der Wasserdampfdestillation zu hohe Dampftemperaturen über längere Zeit entstanden waren und die Drehbandkolonnendestillation nicht sorgfältig genug wasserfrei durchgeführt wurde, so dass möglicherweise der Ester verseifte. Der Rückstand hatte nach diesen Operationen nicht seinen sonst typischen Geruch, und beim Spurtest war auch die biologische Aktivität vermindert.

D Diskussion

Mikroanalytische Methoden zur Auffindung von biologisch wirksamen Substanzen sind Grundlage biochemischer Untersuchungen am biologischen Objekt, für die seit den Arbeiten von BUTENANDT u.a. [11] Wege aufgezeigt worden sind. Auch wenn heute die methodische Technik sehr viel weiter entwickelt worden ist, weist das Prinzip Parallelen auf, das auf der Determination physiologischer Aktivität von chemisch bzw. physiko-chemisch getrennten Biosubstanzen beruht. Das Ziel ist die Identifizierung des biologischen Substrats mit dem als aktiv erkannten Agens. Dass biologische Analysen solcher Art auf Irrwege führen können, darüber gibt es ungute Erfahrungen; Fremdstoffe, die bis zum Test in das System hineingeraten waren (aus Gefässen oder in gezeichneten Hilfslinien z.B.), täuschten Aktivitäten vor, oder aber Verunreinigungen in Chemikalien gaben einen falschen Hinweis auf die gesuchten Wirkstoffe.

Die in vorliegenden Versuchen verwendeten Substanzen sind dann hinreichend rein, wenn gegebene Verunreinigungen unterhalb der methodischen Nachweisgrenze liegen oder in Vergleichsbestimmungen auszuschliessen sind. Für den Ursprung der im Extrakt nachgewiesenen hochaktiven Substanz geben die Werte der Aktivitätsbestimmung eine vernünftige Wahrscheinlichkeit, dass diese aus der betreffenden Sekretdrüse stammt; die in früheren Untersuchungen nicht ausgeschlossene Möglichkeit anderer Herkunft ist in der zur Verfügung stehenden Gesamtextraktion zwar eingeengt, letztlich aber nicht auszuschliessen.

Die hier festgestellten Ergebnisse sollten Grundlage weiterer Arbeiten bilden, die einzelne Regionen der Versuchstiere oder besser das Sekret selbst zu untersuchen. Es dürfte erfolgreicher sein, Minimalmengen relativ reinen Substrats zu analysieren als Mischextraktionen, die nicht notwendigerweise einen Schluss auf die natürliche Aktivität zulassen müssen, zumal sie durch mehrere Aufarbeitungsschritte mit Fehlern belastet sein können.

Alle drei als hochaktiv erkannte Substanzen können allein oder zusammen, evtl. auch mit früher gefundenen Verbindungen, das natürliche Pheromon der hier untersuchten Termite sein. Interessant ist die Substanz-Spezifität, auf die die Werte der Spuraktivitäten hinweisen: der Methyl-ester der Undecensäure ist mit $5 \cdot 10^3$ SE/mg erheblich weniger wirksam als der Äthyl-ester ($5 \cdot 10^6$ SE/mg). Die entsprechenden Ester der zu den hochwirksamen Laurinsäure-Estern höherhomologen Myristinsäure sind im biologischen Test mit Werten von 500 SE/mg bzw. 0,5 SE/mg nahezu völlig unwirksam.

Der Laurinsäuremethylester ist massenspektrometrisch im Termiten-Extrakt nachgewiesen worden; vielleicht gelingt der Nachweis der anderen spuraktiven Substanzen aus besserem Ausgangsmaterial auch. Sollten die Äthylester der Dodecan- und Undecensäure nicht im natürlichen Pheromon vorkommen, ist ihre höhere Aktivität durchaus biologisch zu interpretieren, denn manchmal sind künstliche Stoffe effektiver als natürliche.

Entscheidende Aufschlüsse aber werden wahrscheinlich Untersuchungen ergeben, die die Aufklärung der biologischen Funktion der als Pheromone spur-

wirksamen Substanzen zum Ziele haben. Wenn auch gegenüber früheren Ergebnissen die Aktivitätswerte der gefundenen Spursubstanzen in der abgeschätzten biologischen Grösse liegen, muss doch noch durch weitere methodische Untersuchungen am biologischen Objekt der Beweis der eindeutigen Identität erbracht werden durch Aufklärung morphologischer und funktioneller Mechanismen der Pheromone.

E Zusammenfassung

1. Es wird eine Übersicht über die neuere Literatur über Pheromone gegeben.

2. Der Termiten-Spurtest wird in seiner methodischen Ausführung verbessert. Die Beobachtung des Lauftests wird durch eine neue Beleuchtungseinrichtung erleichtert.

3. Im Spurtest erweisen sich drei Substanzen als hochaktiv:

Laurinsäuremethylester	mit	10^5 SE/mg
Laurinsäureäthylester	mit	10^7 SE/mg
Undecensäureäthylester	mit	$5 \cdot 10^6$ SE/mg

4. Das Aufarbeitungsverfahren des Termiten-Rohextraktes wird beschrieben. Die Aktivitäten können um den Faktor 10^4 angereichert werden.

5. Gaschromatographische Untersuchungen geben Hinweise auf das Vorkommen der spuraktiven Substanzen im Termiten-Extrakt durch vergleichende Bestimmung von Retentionszeiten.

6. Der Termiten-Extrakt wird präparativ-gaschromatographisch getrennt, und die Fraktionen werden im biologischen Test geprüft. Verbesserte Fallen sollen eine bessere Auswertung und die gezielte massenspektrometrische Analyse ermöglichen.

7. Massenspektren analysieren eine Substanz der Masse 214; eine typische Umlagerung weist eindeutig einen Ester aus. Laurinsäuremethylester ist ein natürliches Spur-Pheromon der Termite Zootermopsis nevadensis.

8. Die Ergebnisse werden im Hinblick auf die Methodik der biologischen und biochemischen Analytik diskutiert.

F Literatur

1) BARTH, R.
Herkunft, Wirkung und Eigenschaften des weiblichen Sexuallockstoffes einiger Pyraliden
Zool. Jb. allg. Zool. Physiol. 58, 297-329 (1937)

2) BECKER, G.
Termiten-anlockende Wirkung einiger bei Basidiomyceten-Angriff im Holz entstehender Verbindungen
Holzforschung 18, 168-172 (1964)

3) BECKER, G.
Spurfolge-Reaktion von Termiten auf Glycol-Verbindungen
Z. angew. Zool. 53, 495-498 (1966)

4) BECKER, G. und H.J. PETROWITZ
Auf Termiten spurbildend wirkende Stoffe
Naturwissenschaften 54, 16-17 (1967)

5) BECKER, G. und R. MANNESMANN
Untersuchungen über das Verhalten von Termiten gegenüber einigen spurbildenden Stoffen
Z. angew. Entomol. 62, 399-436 (1968)

6) BLUM, M.S.
The chemical basis of insect sociality
in: Chemicals controlling insect behavior (M. Beroza, ed.), p. 61-94, Acad. Press 1970

7) BLUM, M.S.
Dimensions of chemical sociality
2. Int. Congr. Pesticide Chem. Israel 1971

8) BLUM, M.S. and J.M. BRAND
Social insect pheromones. Their chemistry and function
Amer. Zool. 12, 553-576 (1972)

9) BROWN, W.L., T. EISNER and R.H. WHITTAKER
Allomones and kairomones: transspecific chemical messengers
BioScience 20, 21-22 (1970)

10) BRUCE, H.M.
Pheromones and behavior in mice
Acta neurol. psychiat. belg.
69, 529-536 (1969)

11) BUTENANDT, A. und P. KARLSON
Über die Isolierung eines
Metamorphosehormons der Insekten
in kristallisierter Form
Z. Naturforsch. 9b, 389-391 (1954)

12) BUTENANDT, A., R. BECKMANN, D. STAMM und
E. HECKER
Über den Sexuallockstoff des
Seidenspinners Bombyx mori.
Reindarstellung und Konstitution
Z. Naturforsch. 14b, 283-284 (1959)

13) BUTENANDT, A., R. BECKMANN und E. HECKER
Über den Sexuallockstoff des
Seidenspinners. I. Der biologische
Test und die Isolierung des reinen
Sexuallockstoffes Bombykol
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.
324, 71-83 (1961)

14) BUTENANDT, A., R. BECKMANN und D. DTAMM
Über den Sexuallockstoff des
Seidenspinners. II. Konstitution
und Konfiguration des Bombykols
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.
324, 84-87 (1961)

15) BUTENANDT, A., E. HECKER, M. HOPP und W. KOCH
Über den Sexuallockstoff des
Seidenspinners Bombyx mori.
IV. Die Synthese des Bombykols
und der cis-trans-isomeren
Hexadecadien-(10.12)-ole-(1)
Ann. Chem. 658, 39-64 (1962)

16) BUTLER, C.G.
Insect pheromones
Biol. Rev. 42, 42-87 (1967)

17) BUTLER, C.G.
Chemical communication in insects:
Behavioral and ecologic aspects
in: Advances in Chemoreception
(J.W. Johnson, D.G. Moulton, A. Turk,
eds.), Vol. I: Communication by
chemical signals, New York 1970

18) CARLSON, D.A., M.S. MAYER, D.L. BILHACEK, J.D. JAMES, M. BEROZA and B.A. BIERL
Sex attractant pheromone of the house fly: isolation, identification and synthesis
Science 174, 76-78 (1971)

19) CARTHY, J.D.
Odour trails of Acanthomyops fuliginosus
Nature 166, 154 (1950)

20) CARTHY, J.D.
The orientation of two allied species of British ant. II. Odour trail laying and following in Acanthomyops (Lasius) Fuliginosus
Behaviour 3, 304-318 (1951)

21) COMFORT, A.
Likelihoad of human pheromones
Nature 230, 432-433 (1971)

22) CURTIS, R.F., J.A. BALLANTINE, R.W. BONSALL and R.P. MICHAEL
Identification of primate sexual pheromones and the properties of synthetic attractants
Nature 232, 396-398 (1971)

23) DAHL, E., H. EMANUELSSON and C. v.MECKLEMBURG
Pheromone transport and reception in an amphipod
Science 170, 739-740 (1970)

24) ESENTHER, G.R., T.C. ALLEN, J.E. CASIDA and R.D. SHENEFELD
Termite attractant from fungus-infected wood
Science 134, 50 (1961)

25) EVANS, L.J.
Female Arctia caja L. attracting other Arctiinae
Entomol. Rec. 64, 86 (1952)

26) FORD, E.
Zygaemidae attracted by the female of Lasiocampa quercus L.
Proc. entomol. Soc. Lond. 1, 20-21 (1926)

27) v.FRISCH, K.
Über den Sitz des Geruchsinnes bei Insekten
Zool. Jb. allg. Zool. Physiol. 38, 1-68 (1921)

28) GABBA, A. and M. PAVAN
Researches on trail and alarm substances in ants
in: Advances in Chemoreception (J.W. Johnson, D.G. Moulton, A. Turk, eds.), Vol. I: Communication by chemical signals, New York 1970

29) GOETSCH, W.
Vergleichende Biologie der Insekten
Akadem. Verlagsges. Leipzig 1940

30) GOULD, E.S.
Mechanismus und Struktur in der organischen Chemie
Weinheim 1962

31) HALDANE, J.B.S.
Animal communication and the origin of human language
Sci. Progr. 43, 385-401 (1955)

32) HIERHOLZER, O.
Ein Beitrag zur Frage der Orientierung von Ips cuvidens Germ.
Z. Tierpsychol. 7, 588-620 (1950)

33) HUMMEL, H.
Beiträge zur Kenntnis der Pheromone. Chemische Untersuchungen des Spurpheromons der Termite Zootermopsis nevadensis Hagen und orientierende Versuche am Voraugendrüsensekret einiger Gazellen
Diss. 1968 Marburg Nat. Fak.

34) HUMMEL, H.
Chemische Anreicherungsversuche zum Studium eines spurwirksamen Pheromons der Termite Zootermopsis nevadensis Hagen
Insectes Sociaux 15, 213-216 (1968)

35) HUMMEL, H. und P. KARLSON
Hexansäure als Bestandteil des Spurpheromons der Termite Zootermopsis nevadensis Hagen
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 725-727 (1968)

36) HUNNEMANN, D.H.
A cautionary note on phthalate esters of Cryptotaenia canadensis
Tetrahedron Lett. 1743 (1968)

37) KAFKA, W.A.
Molekulare Wechselwirkungen bei der Erregung einzelner Riechzellen
Z. vergl. Physiol. 70, 105-143 (1970)

38) KAFKA, W.A.
Molekül und Riechzelle
Umschau Wiss. Techn. 1971, 464-468

39) KAISER, R.
Chromatographie in der Gasphase
Hochschultaschenbücher 22/22a,
Bibliograph. Inst., Mannheim 1965

40) KAISSLING, K.E.
Insect olfaction
in: Handbook of Sensor Ohysiology
(H. Autrum, R. Jung, W.R. Loewenstein, D.D. MacKag, H.L. Teuber, eds.),
Vol. IV: Chemical senses, part 1:
Olfaction (L.M. Reidler, ed.),
p. 351-431, Springer 1971

41) KARLSON, P. und M. LÜSCHER
Pheromone. Ein Nomenklaturvorschlag für eine Wirkstoffklasse
Naturwissenschaften 46, 63-64 (1959)

42) KARLSON, P., M. LÜSCHER und H. HUMMEL
Extraktion und biologische Auswertung des Spurpheromons der Termite Zootermopsis nevadensis
J. Insect Physiol. 14, 1763-1771 (1968)

43) KARLSON, P. und D. SCHNEIDER
Sexualpheromone der Schmetterlinge als Modelle chemischer Kommunikation
Naturwissenschaften (im Druck)

44) KIENITZ, H.
Massenspektrometrie
Weinheim 1968

45) LEVINSON, H.Z.
Zur Evulotion und Biosynthese der terpinoiden Pheromone und Hormone
Naturwissenschaften 59, 477-484 (1972)

46) LÜSCHER, M.
Sozialwirkstoffe bei Termiten
Verhandlg. 11. Internat. Kongr. Entomol., 579-582, Wien 1960

47) LÜSCHER, M. und B. MÜLLER
Ein spurbildendes Sekret bei Termiten
Naturwissenschaften 27, 503 (1960)

48) LÜSCHER, M.
Demonstration of a trail pheromone in termites
Symp. Genet. 11, 189-192 (1961)

49) LÜSCHER, M.
Die Bedeutung des Juvenilhormons für die Differenzierung der Soldaten bei der Termite Kalotermes flavicollis
Proc. VI. Congr. IUSSI, Bern, 165-170 (1969)

50) LÜSCHER, M.
Persönliche Mitteilung

51) MacCONNEL, J.G. and R.M. SILVERSTEIN
Recent results in insect pheromone chemistry
Angew. Chem. (in press)

52) MATSUMURA, F., H.C. COPPEL and A. TAI
Isolation and identification of termite trail-following pheromone
Nature 219, 963-964 (1968)

53) McCLINTOCK, M.K.
Menstrual synchrony and suppression
Nature 229, 244-245 (1971)

54) McLAFFERTY, F.W.
Mass spectrometric analysis.
Molecular rearrangement
Analytic. Chem. 31, 82-87 (1959)

55) McLAFFERTY, F.W.
Decomposition and rearrangements
of organic ions
in: Mass Spectrometry of organic
ions (F.W. McLafferty, ed.),
p. 309-342, Acad. Press 1963

56) McLAFFERTY, F.W.
Interpretation of mass spectra.
An introduction
New York 1967

57) MEINWALD, J. and E. MUETTERTIES
Pheromones
o. bibliogr. Ang.

58) MERTINS, J.W., H.C. COPPEL and F. MATSUMURA
Sternal gland in Calotermes formosanus
(Isoptera: Rhinotermitidae)
Ann. entomol. Soc. Amer.
64, 478-480 (1971)

59) MICHAEL, R.P. and E.B. KEVERNE
Primate sex pheromones of vaginal
origin
Nature 225, 84-85 (1970)

60) MICHAEL, R.P., E.B. KEVERNE and R.W. BONSALL
Pheromones: Isolation of male sex
attractants from a female primate
Science 172, 964-966 (1971)

61) MOORE, B.P.
Isolation of the scent-trail
pheromone of an australian termite
Nature 211, 746-747 (1966)

62) MOSER, J.C. and M.S. BLUM
Trail marking substance of the texas
leaf-cutting ant: source and potency
Science 140, 1228 (1963)

63) MOSER, J.C. and R.M. SILVERSTEIN
Volatility of the trail marking
substance of the town ant
Nature 215, 206-207 (1967)

64) MOSER, J.C., R.C. BROWNLEE and R. SILVERSTEIN
Alarm pheromones of the ant
Atta texana
J. Insect Physiol. 14, 529-535 (1968)

65) MYKYTOWYCZ, R.
The behavioural role of the
mammalian skin glands
Naturwissenschaften 59, 133-139 (1972)

66) NOIROT, C. et C. NOIROT-TIMOTHEE
Ultrastructure de la glande sternale
chez le termite Calotermes flavicollis
Proc. XII. Int. Congr. Entomol.
London 1964, p. 129

67) NOIROT, C. et C. NOIROT-TIMOTHEE
Organisation de la glande sternale
chez Calotermes flavicollis F.
(Insecta, Isoptera). Etude au
microscope électronique
C.R. Acad. Sci. D 260, 6202-6204 (1965)

68) PANDEL, E.
Sexuelle Kommunikation. Der Einfluss
von Pheromonen auf Sexualität und
Fortpflanzung
Diss. 1969 Göttingen Med. Fak.

69) PASTEELS, J.M.
Sex-specific pheromones in a termite
Experientia 28, 105-106 (1972)

70) PRIESNER, E.
Artspezifität und Funktion einiger
Insektenpheromone
Fortschr. Zool. (im Druck)

71) QUENNEDEY, A.
Innervation de type neurosécréteur
dans la glande sternale de
Kalotermes flavicollis (Isoptera):
Etude ultrastructurale
J. Insect Physiol. 15, 1807-1814 (1969)

72) QUENNEDEY, A.
Les glandes exocrines des termites.
Organisation de la glande sternale
des Rhinotermitidae. Etude
ultrastructurale préliminaire
C.R. Acad. Sci. D 273, 376-379 (1971)

73) RITTER, F.J. and C.M.A. COENEN-SARABER
Food attractants and a pheromone as trail-following substances for the Saintonge termite. Multiplicity of the trail-following substances in L. trabea-infected wood
Entomol. Exp. Appl. 12, 611-622 (1969)

74) RITTER, F.J.
Recent developments in the field of insect pheromones
Meded. Fac. Landbouwwetensch., rijksuniv. Gent 36, 874-882 (1971)

75) RYHAGE, R.
Use of mass spectrometer as a detector and analyser for effluents emerging from high temperature gas-liquid chromatography columns
Analytic. Chem. 36, 759-764 (1964)

76) SCHMIDT, H. (Hrsg.)
Die Termiten. Ihre Erkennungsmerkmale und wirtschaftliche Bedeutung
Akadem. Verlagsges. Leipzig 1955

77) SCHNEIDER, D. und E. HECKER
Zur Elektrophysiologie der Antenne des Seidenspinners Bombyx mori bei Reizung mit angereicherten Extrakten des Sexuallockstoffes
Z. Naturforsch. 11b, 121-124 (1956)

78) SCHNEIDER, D.
Elektrophysiologische Untersuchungen von Chemo- und Mechanorezeptoren der Antenne des Seidenspinners Bombyx mori L.
Z. vergl. Physiol. 40, 8-41 (1957)

79) SCHNEIDER, D.
Molekulare Grundlagen der chemischen Sinne bei Insekten
Naturwissenschaften 58, 194-200 (1971)

80) SCHWINCK, I.
Experimentelle Untersuchungen über Geruchssinn und Störungswahrnehmung in der Orientierung bei Nachtschmetterlingen
Z. vergl. Physiol. 37, 19-56 (1954)

81) SHARKEY, A.G.jr., J.L. SCHULTZ and R.A. FRIEDEL
Mass spectra of esters. Formation of rearrangement ions
Analytic. Chem. 31, 87-94 (1959)

82) SONNET, P.E. and J.C. MOSER
Synthetic analogues of the trail pheromone of the leaf-cutting ant, Atta texana (Buckleg)
Life Sci. 1972 (in press)

83) STUART, A.M.
The structure and function of the sternal gland in Zootermopsis nevadensis H. (Isoptera)
Proc. Zool. Soc. Lond. 143, 43-52 (1964)

84) STUART, A.M.
Alarm, defence, and construction bahavior relationships in termites (Isoptera)
Science 156, 1123-1125 (1967)

85) STUART, A.M. and P. SATIR
Morphological and functional aspects of an insect epidermal gland
J. Cell Biol. 36, 527-549 (1968)

86) STUART, A.M.
The role of chemicals in termite communication
in: Advances in Chemoreception (J.W. Johnson, D.G. Moulton, A. Turk, eds.), Vol. I: Communication by chemical signals, p. 79-106, New York 1970

87) SUTTON, G.P.
Zygaenidae attracted by Lasiocampa quercus female
Entomologists 55, 280 (1922)

88) TRUSCHEIT, E. und K. EITER
Synthese der vier isomeren Hexadecadien-(10.12)-ole-(1)
Ann. Chem. 658, 65-90 (1962)

89) TUMLINSON, J.H., R.M. SILVERSTEIN, J.C. MOSER, R.G. BROWNLEE and J.M. RUTH
Identification of the trail pheromone of a leaf-cutting ant, Atta texana
Nature 234, 348-349 (1971)

90) TUMLINSON, J.H., J.C. MOSER, R.M. SILVERSTEIN, R.G. BROWNLEE and J.M. RUTH
A volatile trail pheromone of the leaf-cutting ant, Atta texana
J. Insect Physiol. 18, 809-814 (1972)

91) URBAHN, E.
Abdominale Duftorgane bei weiblichen Schmetterlingen
Jenaische Z. Naturwiss. 50, 277-358 (1913)

92) VERRON, H.
Rôle des stimuli chimiques dans l'attraction sociale chez Calotermes flavicollis (Fabr.)
Insectes Sociaux 10, 297 (1963)

93) WATANABE, T. and J.E. CASIDA
Response of Reticulitermes flavipes to fractions from fungus-infected wood and synthetic chemicals
J. Econom. Entomol. 56, 300 (1963)

94) WHITTAKER, R.H. and P.P. FEENG
Allelochemics: chemical interactions between species
Science 171, 757-770 (1971)

95) WILSON, E.O.
Source and possible nature of the odor trail of fire ants
Science 129, 643-644 (1959)

96) WILSON, E.O.
Chemical communication among workers of the fire ant Solenopsis sacrissima (Fr. Smith). I. The organization of mass-foraging
Anim. Behav. 10, 134-147 (1962)

97) WILSON, E.O.
Chemical communication among workers of the fire ant Solenopsis sacrissima (Fr. Smith). II. An information analysis of the odor trail
Anim. Behav. 10, 148-158 (1962)

98) WILSON, E.O. and W.H. BONERT
Chemical communication among animals
Recent Progr. Hormone Research 19, 673-716 (1963)

99) WILSON, E.O.
Chemical communication in the social insects
Science 149, 1064-1071 (1965)

100) WILSON, E.O.
Chemical communication within animal species
in: Chemical Ecology (E. Sondheimer, J.E. Simeone, eds.), p. 133-155, Acad. Press 1970

101) WILSON, E.O.
The social insects
Cambridge 1971

Diese Arbeit entstand im Physiologisch-Chemischen Institut der Philipps-Universität Marburg vom Februar 1970 bis Oktober 1972 unter der Leitung von Herrn Professor KARLSON.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Dr. Peter KARLSON, danke ich für die Anregung und Betreuung dieser Untersuchungen und die grosszügige Unterstützung, die er mir und dieser Arbeit jederzeit zuteil werden liess.

Ich danke Herrn Prof. M. LÜSCHER, Bern, für wertvollen Rat und fruchtbare Diskussion und vielen Kollegen für zahlreiche gute Hinweise.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren Alverdes, Ankel, Barth, Beermann, Benninghoff, Claussen, Dimroth, Dorer, Ebbinghaus, Graul, Haas, Karlson, Kessel, Kramer, Krüpe, Lettré, Luther, Mattes, Meerwein, Mergner, Niessing, Pirson, Pohl, Pohlenz, Rauen, Rausch, Schlieper, Schmid, Schraub, Schultze, Seidel, Staudinger, Walcher.

Lebenslauf

Als Sohn des Hermann Ronning und seiner Ehefrau Anna, geb. Sebening, wurde ich am 10.2.1925 in Minden geboren. Von 1931 bis 1935 besuchte ich die Bürgerschule I und anschliessend das Bessel-Gymnasium in Minden, wo ich 1943 die Reifeprüfung ablegte. Unmittelbar darauf wurde ich zum Wehrdienst einberufen und nach der Dienstzeit als Schwerkriegsbeschädigter entlassen. Durch die Wirren der Nachkriegszeit und den Tod meines Vaters durch ein Kriegsfolgeleiden konnte ich erst 1949 mein Studium der Naturwissenschaften und vorklinischer und theoretischer Fächer der Medizin aufnehmen.

Ich hatte dann Gelegenheit, am Zoologischen Institut der Universität Marburg mich mit parasitologisch-immunologischen Problemen zu beschäftigen.

Von Jan. 1961 bis Juni 1963 war ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung für Strahlenbiologie und Isotopenforschung an der Strahlenklinik Marburg tätig. Die Forschungsaufgaben umfassten strahlenbiologische Probleme, mikrobiologische Methoden zur Bestimmung von Toxinen und Fermenten im Serum, Arbeiten mit radioaktiv markierten Substanzen und die Weiterentwicklung elektronischer Zähl- und Messmethoden.

Von Juli 1963 bis Dez. 1965 arbeitete ich in der neugeschaffenen Abteilung für Experimentelle Radiologie und Strahlenschutz an der Röntgen-Klinik in Giessen. Im Rahmen des Grundthemas dieses Institutes lernte ich auch das Arbeiten mit Experimentaltumoren. Zusammen mit dem Zoologischen Institut ist die wissenschaftliche Arbeit über "Erholungsvorgänge nach Röntgenbestrahlung bei dem Süßwasserpolypen Pelmatohydra oligactis" in meiner Diplomarbeit und bisher in zwei Kongress-Abstracts erschienen. Die Diplomprüfung umfasste die Fächer Zoologie, Botanik, Org.Chemie und Biophysik.

Von Jan. 1966 bis Jan. 1970 leitete ich am Pathologischen Institut Marburg die Isotopenabteilung. Neben organisatorischen Aufgaben und allgemeiner naturwissenschaftlicher Beratung habe ich einen Forschungsauftrag über "Fremdkörpergranulationsgewebe" mitbearbeitet. Beschäftigt habe ich mich vornehmlich mit den Methoden der Autoradiographie. Nebenamtlich unterrichtete ich an der Staatl. Schule für Med.Techn.Assistentinnen und an der Arzthelferinnenschule.

Seit Febr. 1970 arbeite ich am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr.h.c. P. Karlson an einer Dissertation über Pheromone.